

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2003/003624



PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 03-F-014PCTB	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP2003/003624	International filing date (day/month/year) 25 March 2003 (25.03.2003)	Priority date (day/month/year) 25 March 2002 (25.03.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/18, C12P 21/08, C12N 5/08, 5/18, 15/09, A61L 27/00		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 25 August 2003 (25.08.2003)	Date of completion of this report 01 June 2004 (01.06.2004)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP2003/003624

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages _____ 1-20 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____ 3,4,6-10 _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____ 1,5 _____, filed with the letter of _____ 17 May 2004 (17.05.2004)
- ☒ the drawings:
 pages _____ 1-10 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. _____ 2 _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/03624

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

As described in documents 1 and 2 listed below, the technology of obtaining human liver stem cells using antibodies that react immunologically with antigens that are specifically present in human liver stem cells (human liver precursor cells) was publicly known before the filing date of this application, and therefore this matter is not a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2.

Therefore, the group of inventions concerning antibodies that react immunologically with antigens specifically present in proliferative human liver cells, the hybridoma cells that produce those antibodies, and the isolation of proliferative human liver cells using those antibodies, which are described in claims 1 and 3-6, and the group of inventions concerning the induction of differentiation of proliferative human liver cells described in claims 7-10 do not form one group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and the scope of the claims of this application describes two separate inventions.

Document 1: WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital) January 20, 2000

Document 2: WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina) July 27, 2000

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/03624

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 3-5, 7	YES
	Claims	6, 8-10	NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 3-5	YES
	Claims	6-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1, 3-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

- Document 1: WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital) January 20, 2000 & EP 1097193 A1 & US 6129911 A & JP 2002-520015 A
- Document 2: WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina) July 27, 2000 & EP 114179 A2 & US 2002/0182188 A1 & JP 2002-534974 A
- Document 3: JP 61-189299 A (Nisshin Flour Milling Co.) August 22, 1986
- Document 4: EP 682106 A2 (Research Development Corp. of Japan) May 7, 1996 & US 6004810 A & JP 8-112092 A
- Document 5: Hepatology, Vol. 33, No. 3, pp. 668-675 (2001)
- Document 6: J. Lipid Res., Vol. 41, No. 1 pp. 1-11 (2000)

Claim 6

Based on the descriptions in documents 1 and 2 cited in the international search report, the invention of claim 6 lacks novelty and an inventive step.

Document 1 describes obtaining human liver stem cells using antibodies to antigens that are specifically expressed by human liver stem cells (CK19, CCAM, dipeptidyl peptidase-4, γ GT, VLA-2, VLA-3, VLA-5, VLA-6, CEA, etc.). Document 2 describes obtaining human liver precursor cells using antibodies to specific markers of human liver precursor cells (for example, α -fetoprotein).

As a result, the proliferative human liver cells of the inventions of this application are essentially indistinguishable from the human liver stem cells described in document 1 and the human liver precursor cells described in document 2, and based on the descriptions of the inventions in documents 1 and 2, the invention of claim 6 lacks novelty and an inventive step.

Claims 8-10

Based on the descriptions in documents 1 and 2 cited in the international search report, the inventions of claims 8-10 lack novelty and an inventive step.

Document 1 describes obtaining liver tissue and a liver supplemental device by inducing human liver stem cells to differentiate. Document 2 describes obtaining human artificial liver by inducing human liver precursor cells to differentiate.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP03/03624

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of Box V:

Claim 6

Based on the descriptions in document 4 cited in the international search report, the invention of claim 6 lack an inventive step.

Document 4 describes a process for obtaining rat liver parenchymal cells that can be cloned and propagated. This examination finds that persons skilled in the art can easily obtain human liver parenchymal cells that can be cloned and propagated by applying the process described in document 4 to humans.

Claims 7-10

Based on the descriptions in documents 1, 2, 5 and 6 cited in the international search report, the inventions of claims 7-10 lack an inventive step.

Documents 5 and 6 state that hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) gene activates the cytochrome P-450 (CYP) promoter in hepatocytes. In light of the Examples of this application, the "induction of the differentiation of proliferative human liver cells" described in claim 7 is one and the same as the activation of the cytochrome P-450 gene. Therefore, persons skilled in the art can easily perform the "induction of the differentiation of proliferative human liver cells by inserting the hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) gene into the human liver stem cells described in document 1 and the human liver precursor cells described in document 2.

Claims 1, 3, and 5

The inventions of claims 1 and 3-5 are novel and involve an inventive step with respect to documents 1-6 cited in the international search report.

These documents do not describe the hybridoma cell (FERM BP-8334) that produces antibodies that specifically recognize human proliferative liver cells that can be cloned and propagated, and that have the ability to differentiate into functional liver cells, and persons skilled in the art cannot easily conceive of this matter.

REC'D 24 JUN 2004

WIPO

PCT

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 03-F-014PCTB	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO3/03624	国際出願日 (日.月.年) 25.03.2003	優先日 (日.月.年) 25.03.2002
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C07K16/18、C12P21/08、C12N5/08、C12N5/18、C12N15/09、A61L27/00		
出願人(氏名又は名称) 独立行政法人科学技術振興機構		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 1 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☒ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25.08.2003	国際予備審査報告を作成した日 01.06.2004	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 田 村 明 照	4N 8412
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-20 ページ、出願時に提出されたもの
 明細書 第 ページ、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 ページ、付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 3, 4, 6-10 項、出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 項、PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 項、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 1, 5 項、17.05.2004 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-10 ページ/図、出願時に提出されたもの
 図面 第 ページ/図、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 ページ/図、付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 ページ、出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された磁気ディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列と磁気ディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 2 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☒ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☐ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

下記文献1、2にも記載されているように、ヒト肝臓幹細胞（ヒト肝前駆細胞）に特異的に存在する抗原に免疫反応する抗体を用いてヒト肝幹細胞を取得する技術は出願前公知であるから、PCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、請求の範囲1、3-6に記載された増殖性ヒト肝細胞に特異的に存在する抗原に免疫反応する抗体、当該抗体を産生するハイブリドーマ細胞及び当該抗体を用いた増殖性ヒト肝細胞の分離に関連する発明群並びに請求の範囲7-10に記載された増殖性ヒト肝細胞の分化誘導に関連する発明群とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、本願の請求の範囲には2個の発明が記載されているものと認められる。

文献1：WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital) 2000.01.20

文献2：WO 00/43498 A1 (Univ.of North Carolina) 2000.07.27

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1、3-5、7	有 無
	請求の範囲	6、8-10	
進歩性(IS)	請求の範囲	1、3-5	有 無
	請求の範囲	6-10	
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1、3-10	有 無
	請求の範囲		

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

- 文献1: WO 00/03001 A1 (Rhode Island Hospital) 2000.01.20
& EP1097193 A1 & US 6129911 A & JP 2002-520015 A
文献2: WO 00/43498 A1 (Univ. of North Carolina) 2000.07.27
& EP1147179 A2 & US 2002/0182188 A1 & JP 2002-534974 A
文献3: JP 61-189299 A (Nisshin Flour Milling Co.) 1986.08.22
文献4: EP 682106 A2 (新技術事業団) 1996.05.07
& US 6004810 A & JP 8-112092 A
文献5: Hepatology, Vol. 33, No. 3, pp. 668-675 (2001)
文献6: J. Lipid Res., Vol. 41, No. 1, pp. 1-11 (2000)

請求の範囲6

請求の範囲6に記載された発明は、国際調査報告書に引用された文献1、2により新規性或いは進歩性を有しない。

文献1には、ヒト肝幹細胞に特異的に発現される抗原(CK19、CCAM、ジベプチジルペプチダーゼ4、 γ GT、VLA-2、VLA-3、VLA-5、VLA-6、CEA等)に対する抗体を使用してヒト肝幹細胞を取得することが記載されており、また、文献2には、ヒト肝前駆細胞の特異的マーカー(例えば α -フェトプロテイン)に対する抗体を使用してヒト肝前駆細胞を取得することが記載されている。

したがって、本願発明に係る増殖性ヒト肝細胞と文献1に記載されたヒト肝幹細胞、文献2に記載されたヒト肝前駆細胞を実質的に区別することができないので、請求項6に記載された発明は、文献1、2に記載された発明に基づいて新規性或いは進歩性が否定される。

請求の範囲8-10

請求の範囲8-10に記載された発明は、国際調査報告書に引用された文献1、2により新規性或いは進歩性を有しない。

文献1には、ヒト肝幹細胞を分化誘導させて肝臓組織及び肝臓補助デバイスを得ることが記載されており、文献2には、ヒト肝前駆細胞を分化誘導させて人工肝臓を得ることが記載されている。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

請求の範囲 6

請求の範囲 6 に記載された発明は、国際調査報告書に引用された文献 4 により進歩性を有しない。

文献 4 には、クローン性増殖能を有するラット肝実質細胞の取得方法が記載されている。文献 4 に記載された方法をヒトに適用することにより、当業者であればクローン性増殖能を有するヒト肝実質細胞を容易に得ることができるものと認められる。

請求の範囲 7-10

請求の範囲 7-10 に記載された発明は、国際調査報告書に引用された文献 1、2、5、6 により進歩性を有しない。

文献 5、6 には、肝細胞核因子 4 (HNF 4) 遺伝子が肝細胞においてチトクローム P-450 (CYP) プロモーターの活性化を行うことが記載されている。本願の実施例を参酌すると、請求の範囲 7 に記載された「増殖性ヒト肝細胞の分化誘導」とはチトクローム P-450 遺伝子の活性化に他ならないことから、当業者であれば文献 1 に記載されたヒト肝幹細胞や文献 2 に記載されたヒト肝前駆細胞に肝細胞核因子 4 (HNF 4) 遺伝子を導入してチトクローム P-450 遺伝子を活性化させて「増殖性ヒト肝細胞の分化誘導」を行うことは当業者であれば容易になし得ることである。

請求の範囲 1、3-5

請求の範囲 1、3-5 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献 1-6 に対して新規性及び進歩性を有する。

これらの文献には、クローン性増殖能と機能性肝細胞への分化能とを有する増殖性ヒト肝細胞を特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマ細胞 (FERM B P-8334) が記載されておらず、しかもその点は当業者といえども容易に想到し得ないことである。

請求の範囲

1. (補正後) 成人肝臓から単離した肝細胞集団に存在し、クローン性増殖能と機能性肝細胞への分化能とを有する増殖性ヒト肝細胞を特異的に認識する抗体で
- 5 あって、ハイブリドーマ細胞 Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) が産生する請求項 1 のモノクローナル抗体。
2. (削除)
- 10 3. 請求項 1 のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。
4. Mouse-Mouse hybridoma K8223 (FERM BP-8334) である請求項 3 のハイブリドーマ細胞。
- 15 5. (補正後) ヒト肝細胞集団から、請求項 1 のモノクローナル抗体によって認識される細胞を分離することを特徴とする増殖性ヒト肝細胞の分離方法。
6. 請求項 5 の方法で分離された増殖性ヒト肝細胞。
- 20 7. 請求項 6 の増殖性ヒト肝細胞を分化誘導する方法であって、以下の手段：
(a) 増殖性ヒト肝細胞のスフェロイド培養；および
(b) 増殖性ヒト肝細胞への肝細胞核因子 4 (HNF4) 遺伝子導入、
の少なくとも一方を行うことを特徴とする増殖性ヒト肝細胞の分化誘導方法。
- 25 8. 請求項 7 の方法で分化誘導された機能性ヒト肝細胞。
9. 請求項 8 の機能性ヒト肝細胞を含む細胞キット。
10. 請求項 9 の機能性ヒト肝細胞を充填したハイブリッド型人工肝臓。